论 著

DPEP1基因过表达BT549细胞株的建立和鉴定

郑美玲，魏春莉，刘晓燕，傅俊江
西南医科大学医学基础研究中心·四川省高校表观遗传与肿瘤重点实验室（泸州 646000）

【摘要】**目的** 探讨二肽酶1（dehydropeptidase-1，DPEP1）基因表达载体的构建及DPEP1蛋白在肿瘤细胞中的过表达情况及其影响。**方法** 将DPEP1全长基因PCR扩增，EcoR V和Nhe I双酶切后克隆入带有同样双酶切pcDNA5/FRT/TO表达载体，并获取pcDNA5/FRT/T0/DPEP1，筛选阳性克隆，Sanger测序确证。扩增pcDNA5/FRT/T0/DPEP1质粒并将其转染入BT549细胞系，获得DPEP1过表达，借助Western blot、CCK-8等实验技术分析其表达及影响作用。**结果** 成功构建了DPEP1的过表达载体，转染肿瘤细胞株，并获得DPEP1过表达蛋白，目的蛋白表达明显升高，其过表达的条带灰度约为阴性对照的20倍。**结论** 研究的成功实施为将来阐明DPEP1基因在肿瘤中的作用及机制奠定了实验基础。

【关键词】二肽酶1　载体构建　肿瘤　细胞系
【中图分类号】R34　**文献标志码** A　doi:10.3969/j.issn.2096-3351.2021.04.001

Establishment and identification of DPEP1-overexpressing BT549 cell line

ZHENG Mei-ling, WEI Chun-li, LIU Xiao-yan, FU Jun-jiang
The Research Center for Preclinical Medicine, Key Laboratory of Epigenetics and Oncology of Universities, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

【**Abstract**】**Objective** To explore the construction of dipeptidase 1 (DPEP1) gene expression vector, and to investigate the overexpression of DPEP1 protein in tumor cells and its impact. **Methods** Polymerase chain reaction was used to amplify the DPEP1 full-length gene, and EcoR V and Nhe I were used to perform the double-enzyme digestion. Then the digested products were cloned into the same double enzyme-digested pcDNA5/FRT/TO expression vector to obtain pcDNA5/FRT/T0/DPEP1. The positive clones were screened out and verified using Sanger sequencing. After that, the pcDNA5/FRT/T0/DPEP1 plasmid was amplified and transfected into cell line BT549 to obtain DPEP1 overexpression. Western blot, Cell Counting Kit-8, and other experimental techniques were used to analyze its expression and influences. **Results** The overexpression vector for DPEP1 was successfully constructed and transfected into the tumor cell line, and the DPEP1 overexpressed protein was obtained. The target protein had significantly up-regulated expression, and the overexpressed band had an intensity about 20 times that in the negative control. **Conclusion** The successful implementation of this study lays an experimental foundation for understanding the role and mechanism of action of DPEP1 gene in tumors in the future.

【**Key words**】DPEP1　Vector construction　Tumor　Cell line

肿瘤是机体在各种异常因素作用下产生的新生物，其中恶性肿瘤为医疗界的一大难题，它严重威胁人类的生命健康，是全球发病率和死亡率的主要原因之一，其中50岁以上女性乳腺癌发生率为80%以上。据统计，在目前已知的各种恶性肿瘤中，由于绝大多数患者对该病不够重视，社会科普体系不健全及医院早期诊断、治疗机制不完善等客观因素无法在短时间内解决，也在很大程度上增加了恶性肿瘤

基金项目：国家自然科学基金项目（81672887）；四川省教育厅项目（18ZB0647）；西南医科大学科研项目（00030702）
第一作者简介：郑美玲，硕士。
通信作者：傅俊江，教授，博士。E-mail:fujunjiang@hotmail.com

的病死率[1-3]。同时由于肿瘤的致病因素、易感基因、肿瘤转移、相同肿瘤的不同类型和血管生成机制等与该病有关的各种因素尚未完全清楚[3]，也在某种程度上阻碍了上述各种客观因素的有序推进。

值得注意的是，既往研究中所构建二肽酶1（dehydropeptidase-1，DPEP1）基因表达载体研究与DPEP1蛋白表达相关研究[4]，揭示DPEP1的某些生物学新功能与大肠癌、结肠癌中呈高表达的同时还与其癌症病理标本和负相关参数的侵略性和不良预后均有密切相关。DPEP1可能通过降解基质屏障来促进细胞迁移和血管生成[5]。同时也有研究证实，DPEP1的这种新生物学特性在肿瘤的癌细胞转移、侵袭中也存在。既往研究还证实[6]，肿瘤细胞侵袭性也会受DPEP1的过度表达抑制，吉西他滨（gemcitabine），一种化学治疗剂，治疗时的敏感性也会在DPEP1的影响下递增，表皮细胞生长因子（epidermal growth factor，EGF）治疗可减少DPEP1表达。

DPEP1基因（NM_004413.4）属于肽酶M19家庭，它定位于人类染色体16q24.3。DPEP1长度为28 233碱基对，含9个外显子和8个内含子；它编码411氨基酸，预测分子量为45 674道尔顿。

研究DPEP1调控蛋白水平、稳定性和在肿瘤癌细胞转移、侵袭中的作用，对拓展肿瘤新的治疗靶点、靶标等具有重要意义，也可为肿瘤的实验研究提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

1.1.1 试剂 DMEM培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）和Opti-MEM培养基购自GIBCO公司；EcoR V和Nhe I购自BIO-RAD；DPEP1质粒购自上海吉凯基因化学技术有限公司；One-Step RT-PCR Kit及PCR产物回收试剂盒（德国QIAGEN公司）、Taq plus DNA聚合酶（上海生工生物工程公司）、Trizol试剂盒（美国Invitrogen公司）、Cell Counting Kit-8试剂盒（CCK-8）购自日本同仁化学研究所等，其他试剂盒则参照使用说明书。载体pcDNA5/FRT/TO、大肠杆菌DH5α、HEK-293细胞系、HeLa细胞系、MDA-MB-231细胞系、BT549细胞系、潮霉素B、氨苄青霉素由本实验室保存。

1.1.2 主要仪器 荧光倒置显微镜（日本Olympus公司，型号：IX81）、超低温冰箱（美国Thermo公司）、高速冷冻离心机（美国Thermo公司）、荧光实时定量PCR仪及PCR分析仪（美国ABI公司）、BIO-RAD双向电泳分析系统（美国伯乐公司，型号：Bio-Rad Mini-protean Tetra cell）、全波长酶标仪（美国Thermo公司）等。

1.2 方法

1.2.1 实验步骤 设计实验方案（见图1）后按相关步骤开展各项实验。①应用Primer Express 2.0软件设计DPEP1（NCBI基因库序列号：NM_004413）引物和探针获取DPEP1的cDNA序列（见表1）。②实验步骤：以已有DPEP1 cDNA基因为模板进行高保-聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）扩增DPEP1全长基因。将pcDNA5/FRT/T0表达载体用EcoR V和Nhe I双酶切消化后与相同内切酶消化的DPEP1连接，并获取pcDNA5/FRT/T0/DPEP1。接着进行阳性克隆筛选以获得阳性克隆。最后转染细胞系过表达，并应用Western blot检测DPEP1的表达情况。

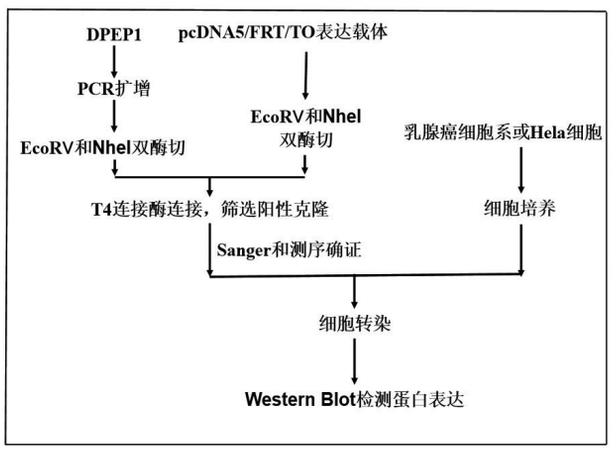


图1 研究方案的基本流程图

表1 DPEP1引物序列表

PCR引物名称	序列
DPEP1-5EcoRV	5'- GCTGGATATCTGGAGCGGATGGTGGCTG -3'
DPEP1-3BamHI	5'- GCTGGATCCCAGGAGAGACAGACAGAG -3'

1.2.2 PCR扩增及克隆 ①反应条件：95 ℃预变性1.5 min，94 ℃ 40 s、65 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min进行35个循环，接着在72℃条件下延伸2 min，16 ℃保存。②PCR产物纯化：所有的PCR产物均经EcoR V、Nhe I双酶切后胶回收纯化处理，然后连入载体并转化至大肠杆菌DH5α中并随机挑选克隆提质粒和电泳，鉴定并将初筛的阳性克隆菌液进行基因测序（Sanger测序法）。重组质粒命名为pcDNA5-DPEP1。

1.2.3 DPEP1质粒的扩增和提取 将重组质粒DPEP1克隆于氨苄青霉素阳性的LB（Luria-Bertani）培养基（37 ℃）中过夜，培养结束后提取质粒。进行琼

脂糖电泳检测质粒提取质量。

1.2.4 细胞转染及构建细胞系 将在含有完全培养基DMEM,10%胎牛血清的12孔培养基中培养的HeLa和BT549细胞密度达到70%左右时,采用脂质体转染法将构建的pcDNA5-DPEP1质粒和pcDNA5质粒分别共转染细胞。取3支已灭菌1.5 mL离心管,向各管分别加入OPTI-MEM、质粒、空质粒,再按顺序分别加入Lipofectamine™ 3000、P3000™、P3000™后,室温静置10 min,再将含有Lipofectamine™ 3000混合液均分至另外两支管并混匀,室温静置10 min。处理细胞后,加入50 μL OPTI-MEM培养基,再缓慢加入已静置10 min的DNA-Lipofectamine™ 3000复合物,水平前后左右轻轻推动培养板各2次混匀并在培养板上做好标记后,将培养板放置在37 ℃ CO_2孵育箱中培养。培养6 h后,吸出培养液,每孔加入含有10%胎牛血清的培养基1mL;观察细胞情况,第2~3 d将细胞传代[7-13]。潮霉素B筛选细胞系,获得潮霉素B抗性细胞系。

1.2.5 蛋白质免疫印迹杂交(Western Blot) 将细胞蛋白裂解液进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electropheresis,SDS-PAGE),10%分离胶,5%浓缩胶,蛋白质电泳至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)上,5%脱脂牛奶封膜,摇床1.5 h,分别加入FLAG或DPEP1和HSP70抗体(1∶5 000),摇床4 ℃过夜;再用1 × TBST洗膜3次,10 min/次。用显影液在凝胶图像成像仪曝光,从而用FLAG抗体和DPEP1抗体分别检测DPEP1蛋白是否成功过表达。HSP70作为内参蛋白[11-15]。

1.2.6 CCK-8法检测过表达细胞系 CCK-8是Cell Counting Kit-8的简称。将转染细胞按70%左右的密度接种到96孔板,100 μL/孔。DPEP1质粒组、空质粒组、对照组、空白组均设置7个平行孔,24 h后加入10 μL/孔的CCK-8溶液,培养2 h后,置于全长酶标仪450 nm处测各孔的吸光度(OD值)[16-18]。

1.3 统计学方法

本实验数据通过SPSS 20.0软件分析,定量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,样本均数比较采用t检验,计数数据比较采用χ^2检验,$P < 0.05$认为差异有统计学意义。

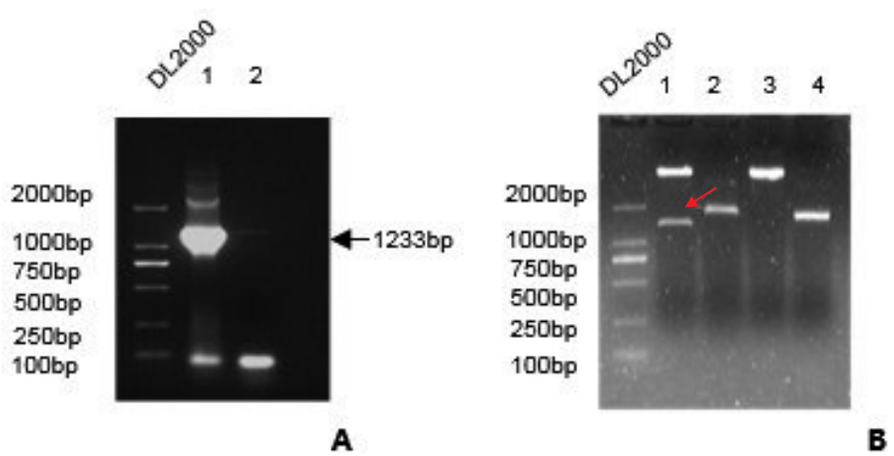
2 结果

2.1 DPEP1 cDNA扩增

以DPEP1基因的cDNA作为模板,高保真PCR多聚酶扩增,获得DPEP1基因片段,再经用EcoR V和Nhe I双酶切消化后和纯化,获得用于克隆中连接所需要的纯化DPEP1片段。

2.2 鉴定重组质粒pcDNA5-DPEP1

采用PCR检测和EcoR V和Nhe I双酶切消化与相同内切酶消化的DPEP1重组质粒pcDNA5-DPEP1,获得pcDNA5/FRT/TO/DPEP1,得到与理论片段相符的1个质粒。图2A是阳性克隆经PCR鉴定结果(黑色箭头标示所扩增的开放阅读框片段大小);图2B是阳性克隆经EcoR V和Nhe I双酶切鉴定的结果(红色箭头标示所酶切的DPEP1片段)。然后进行Sanger测序分析,该基因的Sanger测序分析证明其与DPEP1(NCBI基因库序列号:NM_004413.4;1 233 bp)序列一致(结果未显示)。

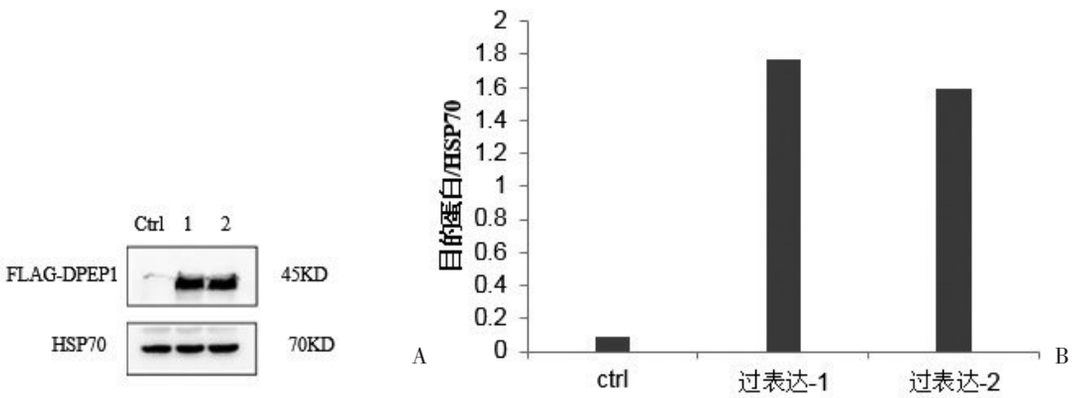


注:A泳道1为阳性克隆,泳道2为阴性克隆;B泳道1为酶切后重组成功的质粒,泳道2为重组成功的质粒,泳道3为酶切后的载体,泳道4为酶切后的DPEP1质粒

图2 DPEP1基因阳性克隆的PCR(A)和酶切鉴定(B)

2.3 DPEP1蛋白过表达分析

构建过表达DPEP1质粒pcDNA5-DPEP1并成功构建稳定细胞系BT549，提取蛋白进行Western blot分析，结果显示我们成功地检测到DPEP1蛋白的过表达（图3A，通道1和2），而阴性对照无表达（图3A，通道Ctrl）。经对目的蛋白DPEP1过表达的WB条带灰度值进行分析，通道1的值约是通道对照组（ctrl）的20.16倍，通道2的值约是ctrl的18.13倍（图3B）。DPEP1蛋白过表达成功证明建立了稳定表达细胞系。

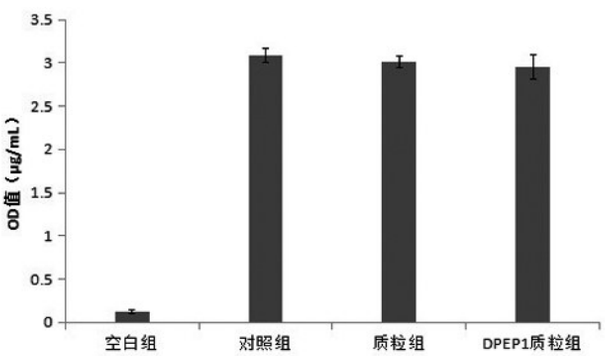


注：A泳道Ctrl为阴性对照组，泳道1为过表达-1组，泳道2为过表达-2组

图3 DPEP1蛋白的过表达及WB条带灰度分析

2.4 DPEP1的生长分析

过表达DPEP1细胞系进行CCK-8检测，BT549过表达组吸光度与其他转染组细胞系进行吸光度分析。其结果以不同组为横坐标、OD值为纵坐标作柱状图显示（图4）。DPEP1过表达组与非DPEP1过表达对照组、空载体质粒组之间的OD值差异不大（分别为$P = 0.054$，$P = 0.092$，$P = 0.87$），无统计学意义（$P > 0.05$），证明DPEP1对肿瘤细胞生长无影响。



注：空白组为不包含肿瘤细胞的组；对照组为非DPEP1过表达对照组；质粒组为空载体质粒组；DPEP1质粒组为DPEP1过表达组

图4 DPEP1质粒转染细胞的OD值柱状图

3 讨论

据统计，在导致乳腺癌发生的各种危险因素（如未婚，未育，晚育，未哺乳等）中经期的早（月经初潮＜12岁）、迟（绝经＞55岁）尤显著，结肠癌主要以腹胀、消化不良、排便习惯改变等消化道症状为主，而子宫颈癌中的阴道不规则流血、排液、疼痛为主要表现，妇科检查可见宫颈糜烂、溃疡或菜花状新生物尤为突出，当然与肿瘤相关的突变基因、易感基因对其有调控作用，机体携带与相关基因也是可能存在的潜在危险[19-23]。乳腺癌是最常见的癌症，也是全世界各地女性因癌症致死的主要原因以及诊断频率最高、根治性差的癌症[18-19]。对于恶性肿瘤的发病机制及对恶性肿瘤未来的治疗方向，主要是将促使癌症发生、发展、转移的基因和途径与在其发展中不发挥作用的基因和途径进行区分，及新型靶向治疗的研究，而DPEP1的研究作为目前肿瘤生物医学研究领域中探讨乳腺癌致病因素及治疗新切入靶点之一，有其研究的必要性与迫切性。

作为肽酶M19家庭的重要成员之一的DPEP1，临床上又将其称作神二肽酶或膜二肽酶、微粒体二肽酶。既往研究表明[24-27]，DPEP1在结肠癌、大肠癌等癌组织中的表达情况均显著高于正常组织，其表达随病理分化程度的降低而降低，也随淋巴结和远处转移情况的下降而下降。研究发现，即使DPEP1在结肠癌、大肠癌等癌组织中呈低表达，但其整体预后效果不是非常显著，当然这在那些根治性手术患者中依旧如此[13,28-30]。

本文以DPEP1的cDNA基因作为模板，高保真

PCR多聚酶扩增而获得DPEP1基因片段,再用EcoR V和Nhe I双酶切消化和纯化,最终获得的DPEP1 cDNA基因序列与DPEP1(NCBI基因库序列号:NM_004413)序列相符。且重组DPEP1蛋白后获得了与理论片段相符的质粒。而在RAPD技术肿瘤组织分析中也发现,乳腺癌中的DPEP1表达有显著的异常扩增特征[26-31],提示DPEP1可能影响肿瘤患者的癌细胞的侵袭性而改变寄主细胞原有的性状或癌细胞的产生提供便利,以及癌细胞的转移起到促进作用,这可能与DPEP1蛋白在肿瘤细胞中存在过表达现象有关[7,20,29]。在分子生物学研究中,通常需要基因/蛋白质的所需表达[26]。上述研究均证实,DPEP1蛋白在肿瘤细胞中能显著的过表达现象。而既往研究[32-34]中的DPEP1 cDNA(结直肠上皮内癌变组织)和蛋白表达情况与病理特征对比分析也发现,二者的表达趋势有显著的一致性,且DPEP1蛋白水平越高其癌变组织发生癌变的可能性也越高。同时也有研究表明[35-36],DPEP1的过表达通过激活PI3K/Akt/mTOR使原本沉默的DPEP1在肝母细胞瘤中起到癌基因的作用。肿瘤癌变进程中表观遗传学的变化能引起抑癌基因失活与原癌基因活化,对不同肿瘤的发生发展、侵袭转移起关键性作用[7,37-41]。结合上述研究可以推断,肿瘤患者的DPEP1表达量升高是随着肿瘤病变的发生、发展而逐渐发生转变的,DPEP1表达在乳腺癌的肿瘤演进机制中发挥了重要作用。DPEP1在恶性肿瘤的瘤变过程中存在显著的过表达特征,且影响肿瘤细胞的侵袭性。

综上所述,此次实验成功构建DPEP1过表达载体并成功构建乳腺癌BT549稳定细胞系,并检测到了DPEP1蛋白过表达,对下游调控信号通路及DPEP1功能的研究可能非常有用。推测DPEP1在恶性肿瘤的病变过程中可能诱导正常细胞转变为癌细胞,可能是恶性肿瘤潜在的一个新治疗靶点。但仍需更多的研究予以证实,而本研究为将来阐明DPEP1基因在肿瘤中的作用及机制奠定实验基础。

4 结论

本研究成功构建了DPEP1的过表达载体及稳定细胞株,并获得DPEP1蛋白的过表达。该研究的成功实施为深入阐明DPEP1在肿瘤中的作用机制奠定了前期实验基础。

参 考 文 献

[1] Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, *et al*. Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements[J]. Biomolecules, 2019, 9(11): 735.

[2] Khan MA, Tania M. Cordycepin in anticancer research: molecular mechanism of therapeutic effects[J]. Curr Med Chem, 2020, 27(6): 983-996.

[3] Tong L, Shen SH, Huang Q, *et al*. Proteasome-dependent degradation of Smad7 is critical for lung cancer metastasis[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(6): 1795-1806.

[4] Lai PL, Chen TC, Feng CY, *et al*. Selection of a malignant subpopulation from a colorectal cancer cell line[J]. Oncol Lett, 2020, 20(3): 2937-2945.

[5] Lindhorst PH, Hummon AB. Proteomics of colorectal cancer: tumors, organoids, and cell cultures-a minireview[J]. Front Mol Biosci, 2020, 7: 604492.

[6] 吴汉青, 王博, 薛寅凯, 等. CpG ODN对胰腺癌细胞PANC1吉西他滨化疗敏感性的影响[J]. 中华胰腺病杂志, 2014, 14(4): 235-237.

[7] 高雪婷, 杜晓媛. LINC00337调控miR-145抑制宫颈癌细胞增殖的机制研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2021, 22(1): 56-57.

[8] Rahimi P, Mobarakeh VI, Kamalzare S, *et al*. Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents[J]. Bratisl Lek Listy, 2018, 119(11): 701-705.

[9] Maeß MB, Wittig B, Lorkowski S. Highly efficient transfection of human THP-1 macrophages by nucleofection[J]. J Vis Exp, 2014(91): e51960.

[10] Zhao BY, Song XD, Guan HH. CircACAP2 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting miR-29a/b-3p-COL5A1 axis[J]. Life Sci, 2020, 244: 117179.

[11] 蒋小丽, 李阳超, 蒋叙川, 等. HIF介导的DEPTOR通过PDCD4c-Jun(AP-1)信号通路参与肝癌HepG2细胞侵袭和血管生成研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(23): 2498-2501.

[12] Gonzalez Villarreal C, Said Fernandez S, Soto Dominguez A, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells: improving transgene expression level, transfection efficiency and cell viability[J]. J BUON, 2018, 23(6): 1893-1903.

[13] 穆继宏, 张浩, 杨玲, 等. GDF5基因真核表达载体的构建及稳定转染HEK293细胞系的建立[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2019, 34(7): 772-774.

[14] 郝鸣, 邱勇, 周军格, 等. 人巨细胞病毒蛋白IE1与高级别胶质瘤患者预后的相关性[J]. 临床神经外科杂志, 2020, 17(6): 658-662.

[15] Wang NX, Yang Y, Pang M, *et al*. MicroRNA-135a-5p promotes the functional recovery of spinal cord injury

by targeting SP1 and ROCK[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 22: 1063-1077.

[16] Wei Q, Tu YZ, Zuo L, *et al*. MiR-345-3p attenuates apoptosis and inflammation caused by oxidized low-density lipoprotein by targeting TRAF6 via TAK1/p38/NF-kB signaling in endothelial cells[J]. Life Sci, 2020, 241: 117142.

[17] Zheng JP, Dai YM, Chen Z, *et al*. Circular RNA circ-ABCB10 promotes non-small cell lung cancer proliferation and inhibits cell apoptosis through repressing KISS1[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(5): 2518-2524.

[18] 敖丽, 王凯, 鲁晓岚, 等. 荧光显微镜联合CCK8法测定原花青素B2对胃癌细胞自噬和凋亡的影响[J]. 中国医疗设备, 2020, 35(S1): 82-84.

[19] 王梦媛, 裴晏梓, 谭理. PD-L1基因表达的调控机制[J]. 生命的化学, 2020, 40(10): 1683-1692.

[20] Ackroyd SA, Goetsch L, Brown J, *et al*. Pancreaticobiliary metastasis presenting as primary mucinous ovarian neoplasm: a systematic literature review[J]. Gynecol Oncol Rep, 2019, 28: 109-115.

[21] Toiyama Y, Inoue Y, Yasuda H, *et al*. DPEP1, expressed in the early stages of colon carcinogenesis, affects cancer cell invasiveness[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(2): 153-163.

[22] Cheng JL, Peng JZ, Fu JW, *et al*. Identification of a novel germline BRCA2 variant in a Chinese breast cancer family[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(2): 1676-1683.

[23] Ichikawa T, Okugawa Y, Toiyama Y, *et al*. Clinical significance and biological role of L1 cell adhesion molecule in gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2019, 121(12): 1058-1068.

[24] Fahad Ullah M. Breast cancer: current perspectives on the disease status[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1152: 51-64.

[25] 黄金华, 温小平, 曾建强, 等. DPEP1在结直肠上皮内瘤变组织中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(6): 1024-1028.

[26] Park SY, Lee SJ, Cho HJ, *et al*. Dehydropeptidase 1 promotes metastasis through regulation of E-cadherin expression in colon cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(8): 9501-9512.

[27] 申昌军, 高娜, 杜江, 等. VEGF、MMP-7、MMP-9、DPEP1在结肠癌并发肾功能障碍中的检测意义[J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(8): 1266-1269.

[28] 牛一茹. 同时性双侧乳腺癌的临床病理特征及预后分析[D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院, 2019.

[29] Kaneko Y, Koi Y, Kajitani K, *et al*. Asymptomatic solitary metastasis to the stomach from breast cancer: a case report[J]. Mol Clin Oncol, 2020, 13(6): 75.

[30] Fu SY, Cheng JL, Wei CL, *et al*. Development of diagnostic SCAR markers for genomic DNA amplifications in breast carcinoma by DNA cloning of high-GC RAMP-PCR fragments[J]. Oncotarget, 2017, 8(27): 43866-43877.

[31] Liu XY, Cheng JL, Mei ZQ, *et al*. SCAR marker for identification and discrimination of specific medicinal Lycium chinense miller from Lycium species from ramp-PCR RAPD fragments[J]. 3 Biotech, 2020, 10(8): 334.

[32] Wang DW, Rai B, Qi F, *et al*. Influence of the twist gene on the invasion and metastasis of colon cancer[J]. Oncol Rep, 2018, 39(1): 31-44.

[33] Liu XY, Khan MA, Cheng JL, *et al*. Establishment of stable cell line for inducing KAP1 protein expression[J]. Acta Biol Hung, 2015, 66(2): 161-168.

[34] 许开宇, 连正杰, 伍江平, 等. 肾二肽酶基因mRNA在左右半结肠腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 结直肠肛门外科, 2017, 23(2): 123-128.

[35] Wei CL, Cheng JL, Zhou BX, *et al*. Tripartite motif containing 28 (TRIM28) promotes breast cancer metastasis by stabilizing TWIST1 protein[J]. Sci Rep, 2016, 6: 29822.

[36] Zhou LY, Liu RJ, Liang XJ, *et al*. lncRNA RP11-624L4.1 is associated with unfavorable prognosis and promotes proliferation via the CDK4/6-Cyclin D1-Rb-E2F1 pathway in NPC[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 22: 1025-1039.

[37] Cui XC, Liu X, Han QC, *et al*. DPEP1 is a direct target of miR-193a-5p and promotes hepatoblastoma progression by PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(10): 701.

[38] He WJ, Zhang JJ, Liu BH, *et al*. S119N mutation of the E3 ubiquitin ligase SPOP suppresses SLC7A1 degradation to regulate hepatoblastoma progression[J]. Mol Ther Oncolytics, 2020, 19: 149-162.

[39] 肖婷, 傅俊江. 肿瘤表观遗传标志物的研究进展及应用现状[J]. 中国癌症防治杂志, 2019, 11(2): 93-98.

[40] 肖婷, 周菊. 组蛋白修饰作为表观遗传肿瘤标志物的研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2019, 42(3): 284-288.

[41] 黎伟, 秦俊, 汪晖, 等. 表观遗传生物标志物在人类疾病早期诊治中的研究进展[J]. 遗传, 2018, 40(2): 104-115.

(2020-06-17 收稿)